



Massespektrometri viser fordelingen af lægemiddelstoffer i planter og væv

Janfelt, Christian; Thunig, Janina; Li, Bin; Andersen, Niels Wellner; Hansen, Harald S.; Hansen, Steen Honore'

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2011

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):

Janfelt, C., Thunig, J., Li, B., Andersen, N. W., Hansen, H. S., & Hansen, S. H. (2011). Massespektrometri viser fordelingen af lægemiddelstoffer i planter og væv. *Lægemiddelforskning*, 2011, 10-12.



Masse-spektrometri

viser fordelingen
af lægemiddelstoffer
i planter og væv

Planters blade er beskyttet af et vokslag, hvilket gør det umuligt at fordampe og ionisere biomolekylerne i overfladen. Derfor tager man et aftryk af bladet på en porøs overflade, som trækker plantestofferne ud af bladet. På fotoet ses et aftryk samt dysen på DESI-MS-udstyret.

En ny form for massespektrometri gør det muligt at optage billeder, som viser fordelingen af kemiske forbindelser i vævsprøver og plantemateriale. Teknikken måler stofferne direkte fra en overflade, så man præcist ved, hvor på overfladen molekylerne befandt sig, da de blev detekteret. Det kan udnyttes til at vise, hvor farmaceutisk aktive stoffer befinder sig i planter, eller til at måle, hvordan et lægemiddelstof fordeler sig i hjernen og kroppen på en rotte.

Af Christian Janfelt, Janina Thunig, Bin Li, Harald S. Hansen, Niels Wellner og Steen Honoré Hansen

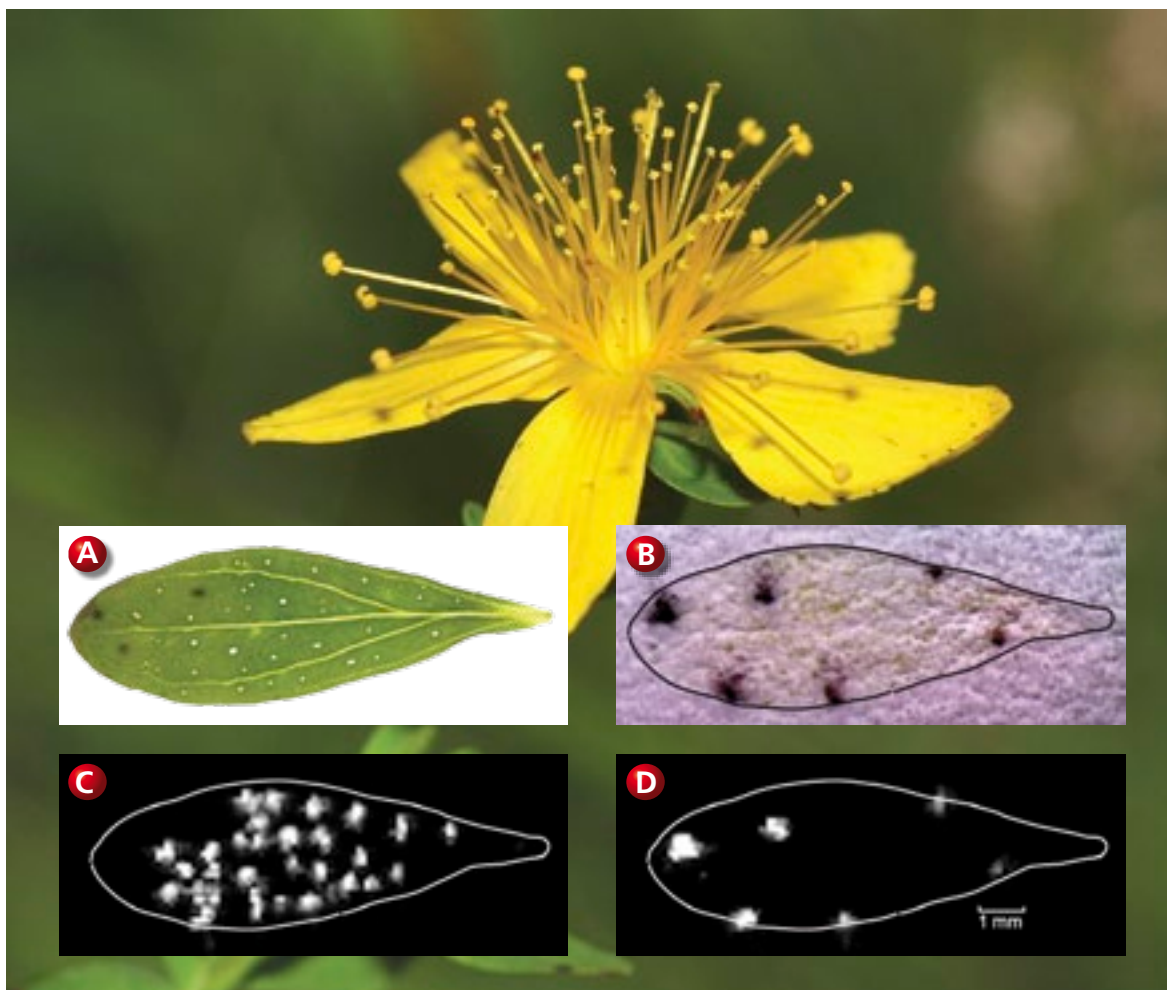
De fleste kemiske analyser af biologiske prøver foretages i dag med massespektrometri, hvor detektion og identifikation af indholdsstofferne er baseret på molekylernes masse. Før målingen ioniseres molekylerne, og derpå vejes de i massespektrometret ved at måle, hvor kraftigt deres bevægelse påvirkes af et elektrisk felt: Ioner med lave masser afbøjes mere end tunge ioner. Resultatet er et massespektrum med en række toppe, hvor hver top repræsenterer et individuelt molekyle med en bestemt masse, og hvor toppens højde viser mængden af det pågældende molekyle

i prøven. Den store fordel ved massespektrometri sammenlignet med andre teknikker er, at målemetoden både er meget følsom og meget selektiv. Derfor benytter man fx massespektrometri til at finde pesticidrester i drikkevand, hvor koncentrationerne ofte er små, og hvor stofferne skal identificeres med stor sikkerhed.

Massespektrometri er også velegnet til at analysere biologiske prøver som blade, vævsprøver eller blodprøver. Her ekstraheres indholdsstofferne normalt over i en væske som metanol, hvorefter ekstraktet analyseres med en metode, som hedder Electrospray ioniserings-massespektrometri (ESI-MS). Inden målingen omdannes væsken til en spray af bittesmå dråber, som fordampes og frigiver molekylerne i prøven som ioner, uden at de går i stykker.

DESI-massespektrometri

For nogle år siden blev metoden videreudviklet til Desorption Electrospray ioniserings-massespektrometri (DESI-MS). Det nye er, at prøven ikke længere behøver at befinde sig på væskeform. I stedet bruger man en elektrisk ladet spray, som rettes mod prøvens overflade og som ioniserer molekylerne på overfladen, hvorefter de analyseres i massespektrometret. Metoden har den åbenlyse fordel, at man kan springe eks-



Billederne viser fordelingen af to naturligt forekommende antidepressive stoffer i et blad fra perikon. **A** er et mikroskopibillede af bladet, mens **B** er et billede af et aftryk. **C** og **D** er optaget med DESI-imaging. **C** viser, at stoffet hyperforin fordeler sig i de gennemsigtige kirtler i bladet, mens **D** viser, at hypericin fordeler sig i nogle olieagtige kirtler i kanten af bladene.

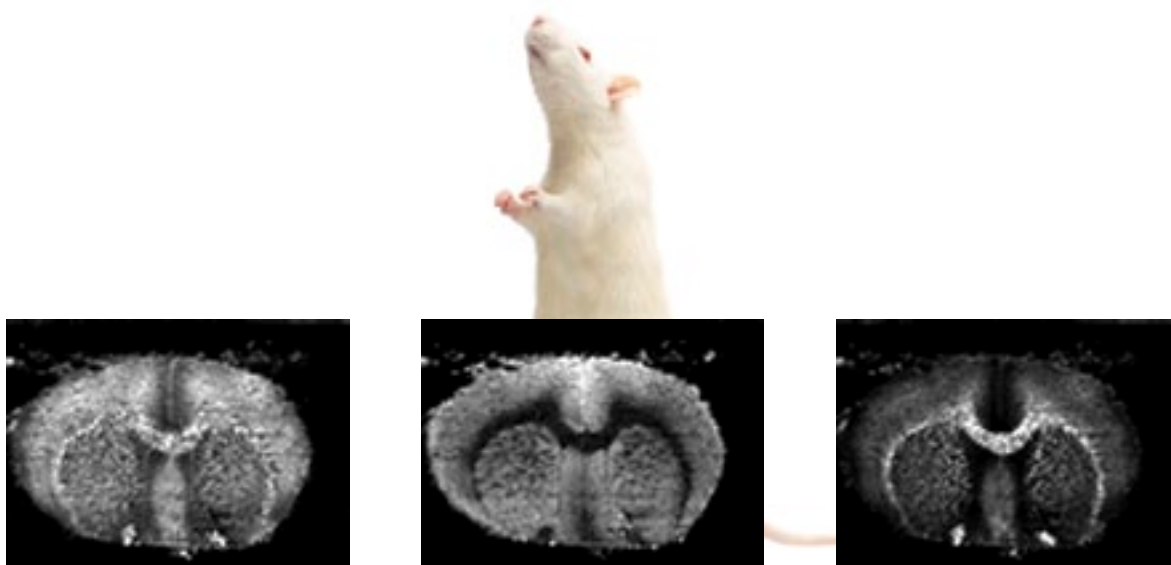
traktionen over og måle stoffer direkte fra et blad eller en vævsprøve, hvilket giver en analysetid på ned til få sekunder. Samtidig bliver stofferne målt på det sted, hvor de befinder sig, i modsætning til ved en ekstraktion, hvor molekyler fra hele prøven blandes i samme ekstrakt, så man derved mister information om præcis, hvor i prøven molekylerne oprindeligt var placeret. Ved at bevæge prøven, mens massespektrometret optager spektre, kan man holde øje med præcis, hvor og hvornår stoffet af interesse viser sig i spektrene.

Scanning og billeddannelse

Ved mere systematiske undersøgelser styrer en computer prøveholderen, så hele overfladen bliver scannet, række for række og punkt for punkt, imens massespektrene bliver optaget. Når det er gjort i løbet af et par timer, har man tusinder af massespektre, et fra hvert punkt på overfladen. Hvis man nu vil kende fordelingen af et bestemt stof, fx et lægemiddel i en vævsprøve, får man computeren til at løbe alle massespektrene igennem og hente intensiteten for massen af lægemidlet ud for samtlige punkter i prøven. Disse intensiteter kan nu afbildes i et diagram, som viser, hvor i prøven de blev målt, og jo større intensiteten er i et givet punkt,

jo stærkere farves det pågældende punkt. Resultatet er et billede af lægemidlet i prøven.

Teknikken er stadigvæk relativt ny, og mange af de første anvendelser har især handlet om undersøgelser af forsøgsdyr, hvor man måler på tynde skiver af vævsprøver monteret på en glasplade. Man kan undersøge vævssnit fra en aflivet rotte og se, om lægemiddelstoffet er nået derhen, hvor det skal virke. Eller man kan kigge på endogene stoffer, som roten selv producerer. Det er fx en kendt sag, at lipiderne, dvs. fedtstofferne, i kroppen er anderledes i en kræftsvulst end i sundt væv. Man kan derfor bruge DESI-imaging både til at lokalisere en svulst meget nøjagtigt og til at undersøge molekyler forandringer i vævet, når det rammes af en sygdom. På Institut for Farmaci og Analytisk Kemi har vi konstrueret en DESI-imaging-ionkilde, som er i stand til at tage billeder af prøver med en opløsning ned til 100 μm . Opløsningen er ikke nede i cellulært niveau – der er altså ikke tale om mikroskopi – men vi er i stand til at visualisere fordelingen af stoffer, som ikke lader sig skelne med almindelige optiske metoder. Noget af det første, vi kastede os over, var at undersøge planter, som indeholder aktive stoffer med anvendelse som lægemidler.



DESI-MS-billeder af et vævssnit, som viser fordelingen af tre forskellige lipider i hjernevævet på en rotte.

Første undersøgelser af lægeplanter

Imens andre forskningsgrupper har lavet mange undersøgelser af vævsprøver fra dyr, var der endnu ikke nogen, som havde brugt metoden til undersøgelser af plantemateriale. Det skulle vise sig, at det heller ikke var så ligetil, fordi blade og blomster har et vokslag, kutikula, som ikke blot beskytter dem imod udtørring, men også imod DESI-imaging, eftersom sprayen har svært ved at trænge gennem voksen. Løsningen blev at lave et aftryk af plantevævet på en porøs teflonoverflade. Fordelen er, at alle stoffer af interesse trækkes ud af plantevævet, samtidig med den rumlige fordeling af stofferne bevares.

Vi brugte denne fremgangsmåde til at analysere blade og kronblade fra prikbladet perikon, *Hypericum perforatum*. Ekstrakter af denne plante sælges som naturlægemiddel på apotekerne til behandling af mild depression på grund af plantens indhold af stofferne hyperforin og hypericin. Forsøg med DESI-imaging af plantens blade viste, at hyperforin befinder sig i gennemsigtige kirtler i bladene, mens hypericin befinder sig i nogle sorte, olieagtige kirtler i kanten af bladene. Dette har tidligere været påvist ved at klippe bladene i meget små stykker og analysere delene hver for sig, men ved hjælp af DESI-imaging var det altså muligt at give et samlet billede af fordelingen af stoffer på et blad.

Analysen af kronbladene viste, at hypericin var lokaliseret i sorte kirtler i kanten af bladene. Da kronbladene, i modsætning til de almindelige blade, ikke har nogen gennemsigtige kirtler, var det ikke åbenlyst, hvordan hyperforin ville fordele sig her, men også her så vi for nogle af kronbladene, at stoffet fordelte sig i lignende prikker. Da prikkerne på kronbladene ikke er synlige, er denne fordeling altså ikke noget man

umiddelbart ville kunne fastslå uden brug af imaging massespektrometri.

Vi lavede lignende analyser af blade fra pigæble, som er kendt for sit indhold af atropin, som almindeligvis er giftigt, men som i kontrollerede doser anvendes som hjertemedicin og som modgift mod krigsgasser. Billederne viste, at mens kulhydrater såsom sukrose var relativt homogent fordelt i bladet, var atropin især lokaliseret i ledningsstrengene i bladet, hvilket tyder på, at stoffet transporteres rundt i netop ledningsstrengene. Ved at lave imaging massespektrometri på planter kan man altså blive klogere på, hvor i planter farmaceutisk interessante stoffer dannes, hvorledes de transporteres rundt i planten, og hvilken funktion de har i planterne. Det er fx muligt at sammenholde den kemiske fordeling af plantestoffer med, hvor og hvordan insekter angriber den pågældende plante og på den måde bliver klogere på planternes forsvarsmekanismer.

Vævsprøver viser lægemidler i hjernen

Senest har vi benyttet DESI-imaging til analyser af vævsprøver fra mus og rotter for at undersøge, hvilke molekyler ændringer, der sker i hjernevævet som følge af en hjerne-skade, hvor ilttilførslen til hjernen rammes. Vi har desuden lavet billeder, som viser fordelingen af et antidepressivt stof i nyren og hjernen fra en mus, som kort tid forinden havde fået stoffet injiceret i bughulen. Foruden selve stoffet påviste undersøgelsen også metabolitter af det, hvilket gør det muligt at følge omsætning af lægemiddelstoffer i organismen. Det er ingen tvivl om, at imaging med massespektrometri giver en lang række nye muligheder inden for det farmaceutiske område.

Ph.d. Christian Janfelt er adjunkt på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Kandidat i miljøvidenskab Janina Thunig er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Cand.pharm. Bin Li er ph.d.-studerende på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi
Cand.scient.pharm. Niels Wellner er ph.d.-studerende på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.scient. Harald S. Hansen er professor på Institut for Farmakologi og Farmakoterapi
Dr.pharm. Steen Honoré Hansen er professor på Institut for Farmaci og Analytisk Kemi

